

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 25 年度博士課程 進学
氏名 岩間 亮
指導教員 堀内裕之

論文題目

酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン代謝とその制御機構に関する研究

n-アルカンは石油中や植物の表面など自然界に広く存在する高エネルギー物質である。細菌や酵母、糸状菌などには、*n*-アルカンを炭素源およびエネルギー源として資化する能力を有するものが存在する。特に酵母では約 1270 種のうち 180 種が炭素鎖長 16 の *n*-アルカンである *n*-ヘキサデカンを資化できることが報告されている。*n*-アルカン資化性酵母において、*n*-アルカンは細胞内に取り込まれた後、小胞体で CYP52 ファミリーに属するシトクロム P450 (P450)により末端が水酸化されて長鎖アルコールへと変換される。長鎖アルコールは小胞体またはペルオキシソームで長鎖アルデヒド、脂肪酸へと順に酸化され、最終的に生成した脂肪酸が脂質の構成因子あるいはエネルギー源として利用されると考えられている。しかしながら、特に長鎖アルコールから脂肪酸への代謝過程に関わる酵素は不明であった。

Yarrowia lipolytica は *n*-アルカンやトリグリセリド、長鎖アルコールなどの多様な疎水性化合物を資化することができる酵母である。*Y. lipolytica* は CYP52 ファミリーの P450 をコードする遺伝子を 12 種 (*ALK1* – *ALK12*)有しており、そのうち *ALK1* および *ALK2* が *n*-アルカン代謝に重要な役割を果たすことが示されているが、他の *ALK* 遺伝子の機能は不明であった。また、*ALK1* の転写は *n*-アルカンにより誘導されるが、その制御に転写活性化因子である Yas1p および Yas2p と、転写抑制因子である Yas3p が関与することが示されている。*n*-アルカンからのシグナルがどのようにこれら因子に伝達されているのかは不明である。本研究では、*Y. lipolytica* における *n*-アルカンの代謝とその制御機構を解明することを目的として解析を行った。

1. *Alk* タンパク質群の機能解析¹⁾

ALK 遺伝子群の役割を明らかにするため、当研究室の高井により 12 種類の *ALK* 遺

伝子を全て破壊した株 ($\Delta alk1-12$ 株)が作製された。そこで、まず $\Delta alk1-12$ 株の性質について解析を行い、 $\Delta alk1-12$ 株では *n*-アルカン誘導性の P450 生産が見られないこと、 $\Delta alk1-12$ 株は *n*-アルカンを長鎖アルコールへと代謝できないこと、 $\Delta alk1-12$ 株は *n*-アルカンを炭素源とした培地では生育できないが長鎖アルコールや長鎖アルデヒド、脂肪酸を炭素源とした培地では生育できることを明らかにした。これらの結果から、*ALK* 遺伝子が *n*-アルカンの資化に必須であることが示された。次に各 *ALK* 遺伝子の機能を明らかにするため、 $\Delta alk1-12$ 株において *n*-アルカン誘導型の人工プロモーター下または構成的に高発現する *TEF1* プロモーター下で *ALK1*~*ALK12* を単独で発現する株を作製した。これらの株について *n*-アルカン培地での生育と *n*-アルカンや脂肪酸の代謝を解析した。その結果、12 種の Alk タンパク質群は、1) *n*-アルカンを基質にするが脂肪酸を基質としないもの、2) *n*-アルカンを基質としないが脂肪酸を基質とするもの、3) *n*-アルカンと脂肪酸の両方を基質とするもの、4) *n*-アルカンと脂肪酸のいずれも基質としないもの、の 4 種類に分類されることが明らかになった。

2. 長鎖アルコール酸化に関わる酵素の同定と機能解析²⁾

近年、*Y. lipolytica* において、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *ADH1*、*ADH2*、*ADH3*、*ADH4*、*ADH5*、*ADH6*、*ADH7*、*FADH* および長鎖アルコール酸化酵素遺伝子 *FAO1* が ω -ヒドロキシ脂肪酸の水酸基の酸化に関わることが示唆された。長鎖アルコールの資化に関わる遺伝子を明らかにするため、これらの遺伝子を全て破壊した株 (ALCY02 株)を作製し解析した。ALCY02 株は長鎖アルコールを単一の炭素源とした培地で生育欠損を示し、長鎖アルコールに対する感受性も大きく増加した。また、ALCY02 株を *n*-ドデカン存在下で培養すると、野生型株と比較して 1-ドデカノールを細胞内に顕著に蓄積することも明らかになった。さらに、ALCY02 株に *ADH1*-*ADH7*、*FADH* および *FAO1* を単独で戻した株の解析から、これらのうち、*ADH1*、*ADH3*、*FAO1* が長鎖アルコール資化において主要な役割を担うことが示唆された。これら 3 つの遺伝子を破壊した株は ALCY02 株と同様に長鎖アルコールを単一の炭素源とした培地での生育欠損を示した。また、これらの遺伝子産物の細胞内局在解析を行ったところ、Adh1p と Adh3p が細胞質および膜面に局在すること、Fao1p がペルオキシソームに局在することが示唆された。これらの結果から、*Y. lipolytica* において、Adh1p および Adh3p は細胞質あるいはいずれかの膜上で、Fao1p はペルオキシソームで長鎖アルコールの資化に関与すると考えられた。

3. 長鎖アルデヒドの酸化に関わる酵素の同定と機能解析³⁾

当研究室の小林らにより行われた *Y. lipolytica* の網羅的転写解析の結果から、*n*-デカンで誘導される遺伝子の中にヒトのアルデヒドデヒドロゲナーゼである ALDH3A2 と相同性のある遺伝子として、機能不明の *HFD1*、*YALI0E15400g*、*YALI0A17875g* が見出された。また、*n*-デカンでは誘導されないが、これらと相同性のある遺伝子として *YALI0B01298g* が見出された。そこで、*YALI0E15400g*、*YALI0A17875g*、*YALI0B01298g*

をそれぞれ *HFD2*、*HFD3*、*HFD4* と命名し、*HFD1* – *HFD4* の機能解析を行った。ノーザン解析および定量的リアルタイム PCR 解析により、実際に *HFD1*、*HFD2*、*HFD3* は *n*-アルカンにより転写産物量が増加することを確認した。これらの単独、2 重、3 重、4 重破壊株 ($\Delta hfd1-4$ 株) を作製し、生育を解析したところ、炭素鎖長 12 以上の *n*-アルカンを単一の炭素源とした場合、 $\Delta hfd1-4$ 株は著しい生育の欠損を示したが、*HFD* 遺伝子を 1 つ以上持つ株は生育することができた。また、*n*-アルカン存在下で培養した場合には、野生型株の細胞破碎液中の長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が大きく増加したのに対して、 $\Delta hfd1-4$ 株の細胞破碎液中では活性の増加は見られなかった。さらに、大腸菌でこれら 4 種類の Hfd タンパク質を発現させたところ、4 種すべての大腸菌の細胞破碎液中に長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が検出された。また、これらのタンパク質の細胞内局在解析を行ったところ、Hfd1p、Hfd2p は小胞体およびペルオキシソームに局在すること、Hfd3p はペルオキシソームに局在することが示唆された。以上の結果から、これら 4 つの遺伝子の産物が *Y. lipolytica* 内で *n*-アルカンの中間代謝産物である長鎖アルデヒドを酸化する酵素であると考えられた。

4. *n*-アルカン資化に関わる Osh タンパク質群の機能解析

ALK1 以外で *n*-アルカン酸化に関わる *ALK2* や *ALK6*、長鎖アルコール酸化に関わる *FAO1*、および長鎖アルデヒド酸化に関わる *HFD1*、*HFD2*、*HFD3* は *ALK1* と同様に *n*-アルカンで発現が大きく誘導されること、それらの転写は *Yas1p*、*Yas2p*、*Yas3p* の制御下にあることが網羅的転写解析から示唆されている。そこで、*n*-アルカン代謝やその制御に関わる因子を探索するため、*Y. lipolytica* の網羅的転写解析で得られていたデータを用いてクラスタリング解析を行い、*ALK1* 様の発現パターンを示す遺伝子を抽出し、解析した。その結果、*Saccharomyces cerevisiae* においてオキシステロール結合タンパク質ホモログをコードする *OSH3* の *Y. lipolytica* におけるオルソログ *YALI0E22781g* (*OSH3* と命名した) の破壊株では、*n*-アルカン資化能が低下していることが明らかになった。*Y. lipolytica* のゲノム配列を検索したところ、オキシステロール結合タンパク質と相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子として *YALI0F16940g*、*YALI0C11693g*、*YALI0A02354g* が見出され、これらをそれぞれ *OSH1*、*OSH4*、*OSH6* と命名した。これらについて破壊株を作製し、解析したところ、*OSH6* 破壊株においても *n*-アルカン資化能が低下していた。さらに、*OSH3* 破壊株および *OSH6* 破壊株の *n*-アルカンの代謝について解析したところ、これらはともに *n*-アルカンの脂肪酸への代謝に欠損を示したことから、*OSH3* および *OSH6* が *n*-アルカン資化に関与することが示唆された。*OSH3* 破壊株および *OSH6* 破壊株では、*ALK1* のプロモーター活性や転写量は野生型株と比較して低下していなかったが、CO 還元差スペクトル解析を行ったところ、*OSH3* 破壊株では *n*-アルカンにより誘導される P450 由来のピークが野生型株と同程度に見られたのに対して、*OSH6* 破壊株では P450 由来のピークが低下していた。この結果から、また、*OSH6* 破壊株では機能的な P450 が生産できないために、*n*-アルカン資化能が低下していることが示唆された。

5. *n*-アルカン資化における細胞膜-小胞体コンタクトサイトの役割

ALK1 の転写制御において中心的な役割を果たす *Yas3p* は *n*-アルカン非存在では核内に局在して標的遺伝子の転写を抑えるのに対して、*n*-アルカン存在下では小胞体に局在し、標的遺伝子の転写抑制が解除される。*YAS3* の *S. cerevisiae* におけるオルソログ *OPI1* の産物は小胞体膜タンパク質である *Scs2p* によって小胞体に係留されることが知られている。当研究室の小林の解析から、*Y. lipolytica* における *SCS2* ホモログの破壊株では、*Yas3p* の局在には異常は見られないものの、*n*-アルカンの資化能は低下することが示された。一方、*S. cerevisiae* において、*SCS2*、*SCS22*、*TCB1*、*TCB2*、*TCB3*、*IST2* が小胞体と細胞膜とのコンタクトサイト形成に関わることが示唆されていた。そこで、*Y. lipolytica* におけるこれらのオルソログを *SCS2*、*SCS22*、*TCB1*、*TCB2*、*IST2* と命名し解析した。*SCS2* 破壊株と比較して、*SCS2*、*SCS22*、*TCB1*、*TCB2* の4重破壊株はグルコースを炭素源とした培地では生育に変化は見られなかったが、*n*-アルカン炭素源とした培地で生育がより悪化することが明らかになった。これらの結果から、*n*-アルカン資化に細胞膜-小胞体のコンタクトサイトが関与する可能性が考えられた。

6. *n*-アルカン代謝に関与する遺伝子の転写制御⁴⁾

当研究室の森により、*ALK1* は *n*-アルカンにより発現が誘導されるが、グリセロールが共存するとその発現が抑制されることが示された。また、このグリセロールによる転写抑制にグリセロールキナーゼをコードする *GUT1* が関与することが示唆された。そこで、グリセロール代謝に関与する *GUT1* およびグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *GUT2* の単独破壊株および2重破壊株について解析し、 $\Delta gut1$ 株ではグリセロールによる転写抑制が見られないことを確認した。この結果から、グリセロールのリン酸化がグリセロール抑制に必要であることが示唆された。一方、 $\Delta gut2$ 株ではグリセロール存在下で遺伝子の転写抑制が見られたが、*n*-アルカン代謝に関わる遺伝子だけではなく広範な遺伝子の発現が抑制されていることが示唆された。

発表論文

1. Iwama R.*, Takai H.*, Kobayashi S., Horiuchi H., Fukuda R., Ohta A. “Construction and characterization of a *Yarrowia lipolytica* mutant lacking genes encoding cytochromes P450 subfamily 52” *Fungal Genet. Biol.*, 2012, **49**(1); 58-64. (*equal contribution)
2. Iwama R., Kobayashi S., Ohta A., Horiuchi H., Fukuda R. “Alcohol dehydrogenases and an alcohol oxidase involved in the assimilation of exogenous fatty alcohols in *Yarrowia lipolytica*” *FEMS Yeast Res.*, 2015, **15**(3); fov014
3. Iwama R., Kobayashi S., Ohta A., Horiuchi H., Fukuda R. “Fatty Aldehyde Dehydrogenase Multigene Family Involved in the Assimilation of *n*-Alkanes in *Yarrowia lipolytica*” *J. Biol. Chem.*, 2014, **289**(48); 33275-33286
4. Iwama R.*, Mori K.*, Kobayashi S., Horiuchi H., Fukuda R., Ohta A. “Transcriptional repression by glycerol of genes involved in the assimilation of *n*-alkanes and fatty acids in yeast *Yarrowia lipolytica*” *FEMS Yeast Res.*, 2013, **13**(2); 223-240 (*equal contribution)